

Title	Structural analysis of H <sup>+</sup> -ATP synthase F <sub>0</sub> domain
Author(s)	中野, 隆行
Citation	
Issue Date	
oaire:version	
URL	<a href="https://hdl.handle.net/11094/46430">https://hdl.handle.net/11094/46430</a>
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、 <a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed">https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed</a> 大阪大学の博士論文について <a href="#">ご参照</a> ください。

*Osaka University Knowledge Archive : OUKA*

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

Osaka University

氏 名 中 野 隆 行

博士の専攻分野の名称 博 士 (理 学)

学 位 記 番 号 第 20022 号

学 位 授 与 年 月 日 平成 18 年 3 月 24 日

学 位 授 与 の 要 件 学位規則第4条第1項該当

理学研究科化学専攻

学 位 論 文 名 Structural analysis of  $H^+$ -ATP synthase  $F_o$  domain  
(プロトン ATP 合成酵素  $F_o$  ドメインの構造解析)

論 文 審 査 委 員 (主査)

教 授 阿久津秀雄

(副査)

教 授 中村 春木 教 授 鈴木晋一郎 助教授 池上 貴久

### 論 文 内 容 の 要 旨

プロトン ATP 合成酵素 ( $F_oF_1$ ) の  $F_o$  ドメインにおける  $c$  リングは回転するプロトンチャネルとして機能している。回転メカニズムとして *E. coli* 由来のサブユニット  $c$  (以下、 $EF_o c$ ) の溶液構造に基づいて、プロトン透過に必須な Asp61 側鎖のプロトンの解離により C 末端ヘリックスがツイストし、その動きが  $c$  リング全体の回転運動を引き起こすというモデルが提案されている。(Rastogi, V.K., Girvin, M.E., *Nature* 402, 263-268 (1999)) 本研究で、*Thermophilic Bacillus* PS3 由来のサブユニット  $c$  (以下、 $TF_o c$ ) の溶液構造を有機溶媒中 (クロロホルム: メタノール=3:1) で決定した。その結果、 $TF_o c$  は  $EF_o c$  と似たようなヘリックス-ループ-ヘリックスのヘアピン構造をとっていた。しかし、プロトン透過に必須な酸性残基 Glu56 ( $EF_o c$  では Asp61) の側鎖の向きが、 $EF_o c$  の pH 5、pH8 における構造にみられる側鎖の向きのいずれとも異なっていた。また、構造の pH 依存性の解析、分子内運動の解析により  $TF_o c$  ではモデルで提案されているような Glu56 側鎖カルボキシル基のプロトンの解離によるサブユニット  $c$  の大きな構造変化は無いことが明らかになった。以上のことから、側鎖の向きが異なったヘアピン構造の存在はヘリックス軸周りの回転、ヘリックス軸方向のずれが容易におこり、その間に多くのエネルギーが低く安定な構造が存在することを示唆している。また、この多くの安定な構造の存在は種によって  $c$  リングの異なったオリゴマー状態が存在する一因となっている可能性がある。本研究で得られた一連の結果と最近、発表された *I. tartaricus*  $Na^+$ -ATPase 由来の  $c$  リングの結晶構造に基づいて、プロトン透過と共役した  $c$  リングの新しい回転メカニズム、side-chain flipping model を導出した。このモデルでは Glu56 側鎖の protonation/deprotonation に連動して Glu56 側鎖が向きを変え、サブユニット  $a$  とプロトンの受け渡しが可能になる。以前、提案されていたサブユニット  $c$  の大きな構造変化を伴うモデルより、エネルギー的な観点から見ても合理的なモデルである。さらに、より本来の生体膜中での環境と近い状態でサブユニット  $c$  を研究するため、 $F_o$  を構成する各サブユニットから  $F_o$  をリボソームへ再構成することをめざした。そのために、まず各サブユニットの発現系、精製法および  $F_o$  のリボソームへの再構成方法を研究した。その結果、均一な  $TF_o c$  リング、リボソームへ再構成された活性のある  $TF_o F_1$  を得ることができた。今後、この系を用いることにより脂質膜中における  $F_o F_1$  の構造研究が可能になると思われる。

## 論文審査の結果の要旨

プロトン ATP 合成酵素は分子量約 50 万の膜蛋白質で、葉緑体のチラコイド膜、ミトコンドリアの内膜、バクテリアの原形質膜に存在する。この酵素は触媒部位を持つ膜表在性の  $F_1$  ドメイン ( $\alpha_3\beta_3\gamma\delta\epsilon$ ) と、プロトンチャンネルを形成する膜内在性の  $F_o$  ドメイン ( $ab_2c_{10-14}$ ) から構成され、サブユニット  $c$  は 10~14 個集まってドーナツ状のリングを形成している。本研究では、熱安定性が高く、生体内で  $c$  リングが 10 個のサブユニット  $c$  から構成されていることが唯一明らかにされている好熱菌 *Bacillus* PS3 のサブユニット  $c$  (以下、 $TF_o c$ ) について、溶液 NMR を用いた立体構造決定、立体構造の pH 依存性の解析、分子内運動の解析を行った。 $TF_o c$  は大腸菌由来の  $EF_o c$  と似たようなヘリックス-ループ-ヘリックスの構造をとっていた。しかし、プロトン透過に必須な酸性残基の側鎖の向きが二つの構造では異なっていた。さらに、カルボキシル基のプロトンの解離によって誘導される  $TF_o c$  の構造変化の有無を調べたところ、それに関係するようなスペクトルの変化は観測されなかった。したがって、 $TF_o c$  は大腸菌のサブユニット  $c$  と異なり、プロトンの解離に伴う C 末端部分での大きな構造変化は起きていないと結論している。さらに、得られた結果と、 $Na^+$ -ATPase の  $c$  リングの結晶構造を総合することにより、 $c$  リングの新しい回転機構、sidechain flipping model を提案した。

本研究はプロトン ATP 合成酵素サブユニット  $c$  の構造とその性質を明らかにした重要な成果であり、プロトン ATP 合成酵素における  $c$  リングの回転とプロトン移動の関連の解明に寄与するものである。よって、本論文は博士 (理学) の学位論文として十分な価値があるものと認める。